

5a

<p>87-204275/29 B04 MOSCOW LOMONOSOV UNIV 31.10.84-SU-807843 (23.11.86) C12n-11/14 C12q-01/32 Determn. of formate ions in aq. solns. - from optical density of soln. confg. NAD and enzyme stabiliser passed through immobilised NAD dependent formate-dehydrogenase CB7-085828</p>	<p>B(4-B2C2, 4-B3B, 10-C4E, 11-C7B2, 12-K4E) determinable formate ion concn. is 5-15 x 10 power minus 6M. Bul.43/23.11.86. (3pp Dwg.No.0/0)</p>
<p>The soln. contg. formate ions, nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) (1-10mM) and formate-dehydrogenase activity stabiliser was forcibly passed through a flow reactor filled with NAD-dependent formate-dehydrogenase, immobilised in an insoluble inorganic carrier and having total activity 0.075-2.2 micro.moles/min., in order that the deg. of substrate conversion was 6-15%. For this purpose, the volume of the specimen was 1.5-3 times greater than that of the specimen. At the outlet of the reactor, the value of the max. optical density of the soln. was measured at 340 nm in a flow cuvette and the formate concn. was derived from previously constructed calibration curves obtd. under similar conditions. USE/ADVANTAGE - In biochemistry for analysis of formations in complex biological mixts. The sensitivity of the process is improved and the method itself is simplified by the fact that there is no need to use solns. of formate-dehydrogenase with different activities. Such solns. have been replaced by the NAD-dependent formate-dehydrogenase immobilised on the inorganic carrier. The min.</p>	

5a



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1271873**

**A1**

(51) 4 C 12 N 11/14, C 12 Q 1/32

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3807843/28-14

(22) 31.10.84

(46) 23.11.86. Бюл. № 43

(71) МГУ им. М. В. Ломоносова  
и Институт биохимии им. А. Н. Баха

(72) В. И. Тишков и А. М. Егоров

(53) Δ616-07(088.8)

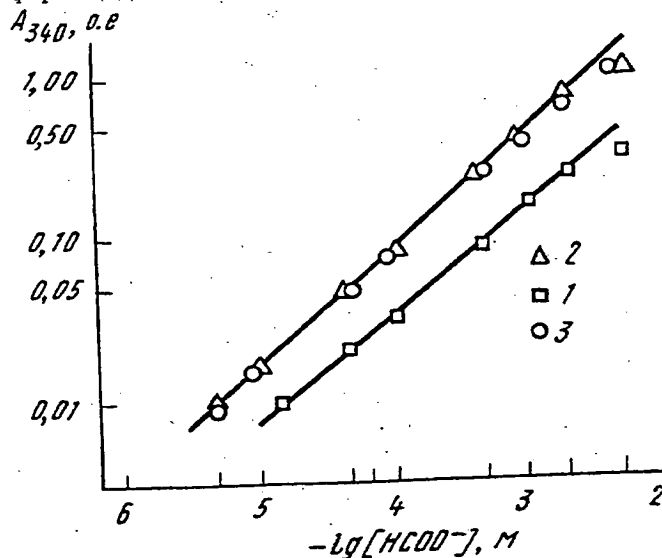
(56) Патент США № 3838011,  
кл. 195 - 103.5, 1974.

Ж. Аналитической химии, 1978,  
т. 33, № 2, с. 364 - 367.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОРМИАТ-ИОНА  
В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

(57) Изобретение относится к биохимии, может быть использовано для анализа формиата в сложных биологических смесях. Цель изобретения - увеличение чувствительности и упрощение способа путем исключения использования растворов формиатдегидрогена-

зы с различной активностью, заменой их НАД (никотинамидадениндинуклеотид)-зависимой формиатдегидрогеназой, иммобилизованной на нерастворимом неорганическом носителе. Для этого исследуемый раствор, содержащий формиат-ионы: НАД (1-10 мМ) и стабилизатор активности формиатдегидрогеназы со скоростью 0,5-5,0 мл/мин через проточный реактор с вытеснением, заполненный иммобилизованной на неорганическом растворителе НАД-зависимой формиатдегидрогеназой с суммарной активностью 0,075-2,2 мкмоль/мин. Объем образца в 1,5-8 раз превышает объем реактора. На выходе из реактора регистрируют величину максимальной оптической плотности образующегося НАД и по калибровочному графику определяют концентрацию формиата. 1 ил.



(19) **SU** (11) **1271873** **A1**

Изобретение относится к области биохимии и может быть использовано для анализа формата в сложных биологических смесях.

Цель изобретения - увеличение чувствительности и упрощение способа за счет устранения необходимости использования растворов форматдегидрогеназы с различной активностью, путем их замены НАД-зависимой форматдегидрогеназой, иммобилизованной на нерастворимом неорганическом носителе.

На чертеже изображены калибровочные кривые для определения формата при степенях конверсии субстрата 5% (1) и 15% (2 и 3) (кривая 1 - реактор 0,2 мл, активность форматдегидрогеназы 0,080 мкмоль/мин, скорость прокачивания образца 0,5 мл/мин, объем образца 0,5 мл; кривая 2 - реактор 0,8 мл, активность фермента 2,2 мкмоль/мин, скорость подачи раствора 5 мл/мин, объем образца 1,2 мл; кривая 3 - реактор 0,6 мл, активность фермента 1,1 мкмоль/мин, скорость прокачивания 2,5 мл/мин, объем образца 0,9 мл; концентрация НАД во всех экспериментах 1,25 мМ, 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,0, 20°C).

Способ осуществляется следующим образом.

Исследуемый раствор, содержащий формат-ионы, НАД (1-10 мМ) и стабилизатор активности форматдегидрогеназы, пропускают со скоростью 0,5-5,0 мл/мин через проточный реактор с вытеснением, заполненный НАД-зависимой форматдегидрогеназой, иммобилизованной на нерастворимом неорганическом растворителе с суммарной активностью 0,075-2,2 мкмоль/мин, так, чтобы степень превращения субстрата составила 5-15%. Для этого объем образца в 1,5-8 раз превышает объем реактора. На выходе из реактора регистрируют величину максимальной оптической плотности образующегося НАД и по калибровочному графику определяют концентрацию формата.

**Пример 1.** Проточной реактор с вытеснением объемом 0,2 мл содержит 80 мг иммобилизованной на аминосилехроме или стекле форматдегидрогеназы с суммарной активностью 0,075 мкмоль/мин при pH 7,0 и

20°C. К 0,3 мл раствора формата натрия (1,5 объема реактора) в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,0) добавляют 25 мкл 25 мМ раствора НАД и про-

пускают через реактор со скоростью 0,5 мл/мин при 20°C. Оптическую плотность раствора на выходе из реактора измеряют при 340 нм в проточной кювете. Минимально определяемая концентрация формата составляет  $1,5 \cdot 10^{-5}$  М. Зависимость оптической плотности от концентрации формата представлена на чертеже (кривая 1).

**Пример 2.** Выполняют способ, как в примере 1, за исключением того, что активность фермента составляет 2,2 мкмоль/мин, скорость подачи раствора 5,0 мл/мин, соотношение объемов образца и реактора 8:1 (4,8 и 0,6 мл соответственно). Зависимость оптической плотности от концентрации формата представлена на чертеже (кривая 2). Минимально определяемая концентрация формата равна  $5 \cdot 10^{-6}$  М.

**Пример 3.** Способ выполняют, как в примере 1. Объем реактора 0,6 мл, активность фермента 1,1 мкмоль/мин, объем образца 1,2 мл (соотношение 2:1), скорость подачи раствора в реактор 2,5 мл/мин. Данные представлены на чертеже (кривая 3). Минимально определяемая концентрация формата  $5 \cdot 10^{-6}$  М.

### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения формата-иона в водных растворах путем ферментативного восстановления никотинамидадениндинуклеотида при помощи НАД-зависимой форматдегидрогеназы с последующей регистрацией содержания восстановленного никотинамидадениндинуклеотида, отличающийся тем, что, с целью увеличения чувствительности и упрощения способа за счет устранения необходимости использования растворов форматдегидрогеназы с различной активностью, анализируемый образец пропускают со скоростью 0,5-5,0 мл/мин через проточный реактор с вытеснением, заполненный иммобилизованной на нерастворимом неорганическом носителе НАД-зависимой форматдегидрогеназой при активности фермента 0,075-2,2 мкмоль/мин и соотношении объемов образца и реактора (1,5-8):1.



XP-002233356

AN - 1985-078062 [13]

AP - JP19830139180 19830729

CPY - WAKP

DC - B04 D16

DR - 0075-S 0118-U 0203-U

FS - CPI

IC - C12Q1/32

MC - B04-B02C B04-B03 B04-B04D B07-D09 B10-A17 B11-C08 B12-K04 D05-A02

M1 - [04] M423 M430 M782 M903 N102 N134 P831 Q233 V802 V811

- [05] M423 M760 M903 N102 N134 Q233 V600 V614

- [07] M423 M430 M782 M903 N102 N134 P831 Q233 V802 V815

M2 - [01] F011 F012 F014 F522 H1 H100 H121 H181 H2 H201 J5 J521 K0 L9 L910

M210 M211 M273 M281 M320 M413 M510 M521 M530 M540 M750 M903 M910 N102  
N134 Q233

- [02] B615 B702 B713 B720 B797 B815 B832 D011 D019 D931 F011 F012 F013  
F014 F015 F019 F113 F199 F431 H1 H100 H122 H2 H201 H4 H404 H424 H8 J0

J011 J3 J311 K0 L7 L721 L8 L812 L819 L821 L834 L9 L943 M280 M311 M322

M342 M373 M392 M411 M430 M511 M523 M530 M540 M782 M903 M910 N102 N134  
P831 Q233 V0 V762 V801

- [03] J0 J011 J1 J171 K0 L2 L250 M210 M211 M273 M281 M311 M321 M342  
M349 M381 M391 M416 M620 M750 M903 M910 N102 N134 Q233

M6 - [06] M903 P723 P831 Q233 R515 R521 R611 R624 R627 R639

PA - (WAKP) WAKO PURE CHEM IND LTD

PN - JP60030696 A 19850216 DW198513 008pp

PR - JP19830139180 19830729

XA - C1985-034113

XIC - C12Q-001/32

AB - J60030696 Creatinine amide hydrolase, creatine amidino hydrolase,  
sarcosine oxidase, formaldehyde dehydrogenase, formate dehydrogenase  
and coenzyme NAD (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) are  
combined and reacted, and the NADH (reducing-type nicotinamide adenine  
dinucleotide) thus produced is measured.

- Method of measuring the quantity of creatine in a sample to be  
inspected is characterised by the following: Creatine amidino  
hydrolase, sarcosine oxidase, formaldehyde dehydrogenase, formate  
dehydrogenase and coenzyme NAD are combined and reacted, and the NADH  
produced measured.

- USE/ADVANTAGE - This method is useful in the diagnosis of kidney  
disease, muscular trouble, etc.. This method gives high specificity,  
is simple in operation, unaffected by the substances coexisting in the  
sample, and has high measuring sensitivity and accuracy.(0/0)

AW - NICOTINAMIDE ADENINE DI NUCLEOTIDE REDUCE FORM

AKW - NICOTINAMIDE ADENINE DI NUCLEOTIDE REDUCE FORM

IW - MEASURE CREATININE QUANTITY SAMPLE CREATINE AMIDE HYDROLASE CREATININE  
AMIDINO HYDROLASE SARCOSINE OXIDASE DEHYDROGENASE COENZYME NAD  
DETERMINE NADH

IKW - MEASURE CREATININE QUANTITY SAMPLE CREATINE AMIDE HYDROLASE CREATININE  
AMIDINO HYDROLASE SARCOSINE OXIDASE DEHYDROGENASE COENZYME NAD  
DETERMINE NADH

NC - 001

983-07-29

ORD - 1985-02-16

PAW - (WAKP ) WAKO PURE CHEM IND LTD

TI - Measuring creatinine quantity in sample - using e.g. creatine amide  
hydrolase, creatinine amidino hydrolase sarcosine oxidase  
dehydrogenase and coenzyme NAD determining NADH